

細胞レベルの概日リズム測定からわかる植物の時間秩序

小山時隆[✉]

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物学系

概日時計の基本発振装置が個々の細胞に備わっていることは動物、植物、バクテリアを含め生物一般にいえることであろう。一方、動物も植物も多細胞生物であり、概日リズムの生理学的意義は個々の細胞に限らず、組織や個体レベルの日周期的な挙動の中に見出される。その関係性は、時計をもつ人々が形成する集団・社会の中で、個々人の時計の利用価値と社会そのものの時間（時計）の共有性／利用価値が不可分であることにも例えられよう。それぞれの社会や個人に必要とされる時計の精度や時計の標準時刻など、時間に関わる注目点は多数あげられる。筆者は、植物個体という細胞集団・社会に注目し、その社会を壊すことなく個々の構成員（細胞）の概日時計の挙動を観測することに成功した。本総説では、個体内における個々の細胞概日時計の挙動について、その観測手法、時間精度、同調様式など、筆者らの成果を含めて論じる。

1. はじめに

植物に限らず生物一般に、概日時計は個々の細胞に備わっていると考えられている。概日時計を持っている細胞だからといって、個体外部の周期的環境変動への概日時計の同調機構が全て備えられているわけでは必ずしもないが、およそ1日の周期性を生み出す基本的なメカニズムは細胞の中にある。一方で、葉の就眠運動や花の開花時間、動物の就眠など私たちが普通に観察したり感じたりすることのできる概日リズムは巨視的な現象であり、細胞の概日リズムがそれらの現象の基盤であっても、細胞概日時計の動きとして実感しにくい。単細胞性の生物が示す概日リズムについては、たとえ細胞集団のリズムとして観察されたとしても、それは個々の細胞が示す概日リズムを反映していると理解されるだろう。カサノリの光合成活性の周期性やクラミドモナスの走光性、細胞分裂の周期性といった単細胞性緑藻の概日リズムが1960年代から知られている¹。緑藻は草木などの陸上植物と同じ緑色植物のグループに属することから、私たちが普段目にする植物の概日時計を考える際のモデル系とみなすことができる。なお、ユーグレナ（ミドリムシ）や渦鞭毛藻（ゴニオラックスなど）は光合成する生物として古くから概日リズムの研究対象とされてきたが、これらは緑色植物とは系統的に離れたグループに属しており、植物と同列に議論するのは難しい²。概日時計の分子機構についての近年の研究から、緑色植物全体の先祖型と考えられる緑藻や陸上植物の先祖型で

あるコケ植物において、概日時計を構成するコアな時計タンパク質は被子植物のものと同通性がみられることが分かってきた³。植物の概日時計システムは緑藻のものと比較すると複雑であるが、その原型は単細胞生物だったころに形成されたと考えられる。つまり、進化的にも植物の概日リズムは細胞自律的なシステムを基本として発展してきたと考えられる。植物でこれまでに明らかにされてきた主な時計タンパク質は転写調節因子であり、動物の概日時計同様に、その発振機構は転写・翻訳フィードバックループを基盤としている⁴。この点においても概日時計の細胞自律性がみてとれる。一方で、ほ乳類の概日時計システムと異なる点として、すべての細胞が光受容体を持っていることが挙げられる。明暗周期の感知も含めて概日時計システムがワンセットそろっている植物細胞の個体内での挙動はどのようなものであろうか？

2. 都合のいい材料と方法：ウキクサと一過的発光レポーター導入系

ウキクサは池や水田で見ることができるよう、水に浮かんで暮らす小さく扁平な植物である（図1A）。見た目は単純だが花をつける単子葉植物で、サトイモの仲間である。土壌に生え、立体的に成長する一般的な植物とは異なり、水に浮かび扁平であるという構造的特徴から、植物体の上面が常に水平を維持している。そのため、実験の観点からは、通常の栽培時でも真上

✉ oyama@cosmos.bot.kyoto-u.ac.jp

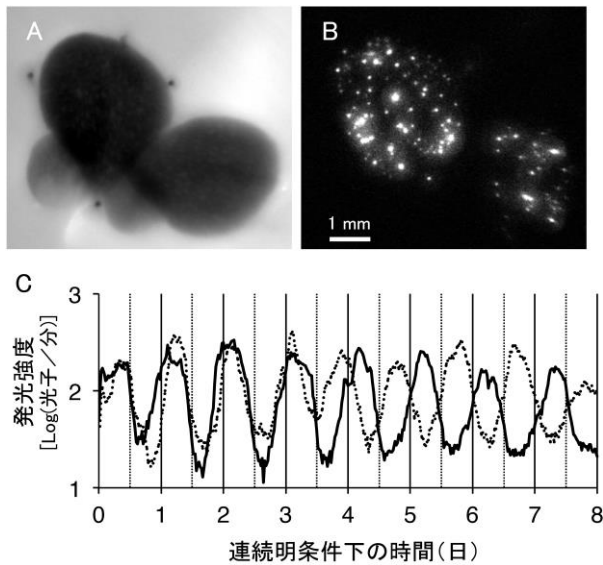


図1 ウキクサ個体内の細胞発光モニタリング。
パーティクルボンバードメント法で発光レポーター遺伝子を導入したイボウキクサ (*Lemna gibba*) の明視野像 (A) とEM-CCDカメラで撮影した発光画像 (B)。(C) *AtCCA1::LUC*レポーターを導入した細胞発光変動例。明暗同調されたウキクサを連続明条件下で30分毎に発光画像取得した。

から同じ距離 (焦点) で長期間観察することが可能な植物材料となっている。これらのウキクサの特性を生かすことで、植物個体全体の高空間解像度イメージングが容易になるだけでなく、植物の成長を伴う長期間の測定も容易になる点に筆者は注目した。また、個体中の個々の細胞の概日リズムを観測するために、パーティクルボンバードメント (パーティクルガン、ジーンガン) による発光レポーター遺伝子導入系を取り入れた。パーティクルボンバードメント法は一過的な遺伝子発現系の1つとして、古くから植物細胞への遺伝子導入法として用いられてきた。『一過的』という言葉の語感からか、概日リズムのように長期間測定のために用いるのは不適当と思われていたが、筆者らが時計遺伝子プロモーターでドライブしたホタルルシフェラーゼ遺伝子 (例えば *AtCCA1::LUC*) をウキクサに導入したところ、生物発光は導入後1週間以上持続することがわかった^{5,6}。さらに、シアノバクテリアの概日リズム観測用に、名古屋大の近藤らによって開発された光電子増倍管を利用した自動生物発光モニタリング装置を使えば、非常に簡便に植物の概日リズムを測定できることがわかった。また、『ボンバード』や『ガン』という物騒な語感から、対象材料へのダメージが心配になる。ウキクサのような水生植物は重力に逆らう必要がなく、一般的な陸生の植物より細胞壁の構造が弱い。そのため、ウキクサを材料にするとDNAを付着させた金粒子をパーティクルガンで打ち

込む際の圧力を弱く設定でき、植物体へのダメージを少なくすることが可能となる。パーティクルボンバードメント法をもちいると、植物体の表面近く (表皮細胞およびその下にある葉肉細胞) に遺伝子が導入されるが、すべての細胞に遺伝子導入されるわけではなく、ごく一部の細胞でのみ外来遺伝子が発現する。この導入特性から、発光遺伝子を発現させた植物個体に対し、カメラ/ビデオ用レンズを装着した高感度カメラで真上からイメージングを行うと、夜空の星のように個々の細胞の発光を検出することができる (図1B)。ウキクサは被子植物の中では非常に小さいサイズ (用いているウキクサは径が5mm程度) であるが、この方法で100個程度の発光スポットを1つの個体 (葉状体あるいはフロンドと呼ばれる部分) 上で同時に観測することは容易である。ウキクサの上面の表皮細胞は数万個あるので、発光細胞は導入可能細胞全体の1%未満であるが、それでも観測した個々の細胞の挙動から個体の細胞全体の挙動を推測することができる。図1A,Bはカメラ/ビデオ用のレンズで撮影した像であるが、顕微鏡を使って細胞発光イメージング時の空間解像度を上げることも可能である。ただし、顕微鏡を用いると、像拡大に伴う焦点深度の減少によって、個体中の発光スポットを同時に多数測定するのが困難になる。また、長時間測定においては、個体成長に伴う上下軸方向の微小な移動があるため焦点を維持し続けることも困難となる。一方、空間解像度という点ではGFPのような蛍光タンパクを用いるのがベストな選択肢であり、蛍光タンパクを利用した細胞の概日リズム測定は動物だけではなく、植物においてもなされている⁷。ただし、植物の細胞は光受容体を持っており、蛍光観察時に必要となる励起光の照射が概日時計そのものの挙動に影響を与えるため、適用できる条件に制限がかかる。たとえば、蛍光タンパクレポーターによる連続暗条件での細胞概日リズム観測は不可能である。また、動物組織と異なり植物はクロロフィル (葉緑素) をはじめとする様々な色素を多量に含んでおり、蛍光タンパクの定量的観測は一般的に難しい。ウキクサというユニークな植物を材料とし、通常条件下で生育した個体中の細胞概日リズムを観測する手法についてあれこれ述べてきたが、ウキクサは概日リズム研究や光周性研究へ厳密な生理学実験が適用された植物材料の草分け的存在でもあり、時間生物学との相性がよいのも利点となっている^{8,9}。

筆者らが開発した細胞発光測定系では、個体上の細胞概日リズムを1週間以上観測可能である^{10,11} (図1C)。イボウキクサを用いると連続明条件下ではどの

細胞も概日リズムを示す一方で、連続暗条件下では細胞概日リズムの急激な低振幅化（あるいは周期性の消失）と長周期化がおこることが明らかとなった。連続暗条件下で概日リズムが減衰・消失する性質は属の異なるウキクサでも共通して見られることが示唆されている¹²。ただし、この性質は植物に一般的なものではなく、たとえばモデル植物のシロイヌナズナでは連続暗条件下でも概日リズムは安定に維持される¹³。次節から、ウキクサを使った筆者らの細胞概日リズムの解析でわかってきた、細胞概日時計の品質、個体内での空間的な時間制御、細胞概日時計のバラツキ、環境応答性について述べる。ただし、連続暗条件下の周期性に見られるように、植物一般的な性質である保証はないことに注意されたい。もっとも、シロイヌナズナの概日時計の性質が一般的という保証もどこにもない。

3. 細胞概日時計の時間精度：動物並みに悪い

私たちの生活の中で時計はなくてはならないものであるが、最近ではスマホやパソコンの画面が時計と同義になりつつあるようだ。それでも、クォーツ式時計や機械式ムーブメントを持つ腕時計などクラシカルな時計もまだまだ健在だ。時計の時間精度は高級なクォーツ式で年差10秒以内、高級な機械式で日差10秒以内程度であろう。機械式時計の改良にどれだけお金をかけて頑張っても“年”差で語れる時間精度には達しないだろう。また、温度や振動など時計を使う環境に時間精度は依存するので、これら環境変動に対する精度維持（頑健性）も時計品質の重要なファクターとなる。生物の持つ概日時計の品質を細胞単位で比較した場合、知られている範囲で最も精度がよいのはシアノバクテリアの概日時計だ。3種類の Kai 時計タンパク質を構成部品とし ATP をエネルギー源に概日発振するタンパク時計である¹⁴。時計の精度を平均周期長に対する標準偏差で表すと *Synechococcus elongatus* PCC 7942（概日リズムの研究に使われるシアノバクテリア）の場合は、平均周期長25時間程度に対して標準偏差が0.1時間程度と推定されている¹⁵。1日のずれが10分程度（平均周期に対する偏差という意味で）のシアノバクテリア時計であれば、クォーツ式時計が普及する前の世界であれば使えるレベルに達しているのではないだろうか。培養条件下でのシアノバクテリアにおいては時計の針が一周する間には細胞分裂がおこることから、細胞内環境の大きな変化を経験しても、この程度の時間のずれしか生じさせない頑健性をこの時計は保持していることが

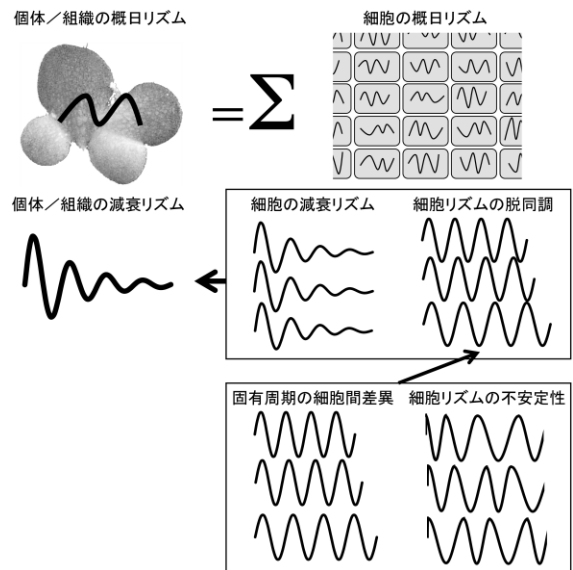


図2 個体/組織が示す概日リズムと個々の細胞概日リズムの関係性。遺伝子発現リズムなど細胞概日リズムの総和が細胞集団のリズムになる場合について、個体/組織レベルの減衰リズムの要因となる細胞概日リズムの様態を示す。

わかる。

時計の品質を決める上で個々の時計の時間精度は重要だが、同じ時計を使う集団の観点からは時計間の品質の均質性も重要なポイントとなる。マウスの SCN での時計の精度に関する報告によると、平均周期が24時間程度に対して、バラバラにして培養された SCN のニューロン間のバラツキは標準偏差で1.28時間、周期毎のバラツキは2.07時間と推定されている^{16,17}。周期毎のバラツキと比較すると細胞間のバラツキは小さいことがわかる。また、マウスの線維芽細胞の培養下での細胞概日リズムを6週間という長期にわたって測定した結果によると、平均周期は25時間程度で細胞間のバラツキ（標準偏差）は0.77時間で、周期毎のバラツキは1.97時間と推定された¹⁸。1日に2時間もずれる時計は現代社会では使い道がなさそうだが、この時間精度の悪さと比べると、細胞概日時計間の平均的な周期のズレは小さく、細胞間の均質性という点が生物にとってより重要度が高いことが示唆される。

さて、植物個体あるいは組織レベルの概日リズムは恒常条件下で減衰する場合が多い¹⁹。個体あるいは組織レベルの減衰リズムが観測された場合、その要素となる細胞のレベルでは、2つのことが生じている可能性がある（図2）。細胞レベルのリズムも減衰している場合と、細胞間でリズムの位相がずれていく脱同調の場合である。また、脱同調を生じさせる要因としては、固有周期の細胞間の差異と個々の細胞概日リズム

の不安定性の2つが挙げられる。動物の細胞概日リズムのバラツキに関する上記の説明と対応付けると、前者が細胞間のバラツキであり、後者は周期毎のバラツキとなる。発光レポーターを利用した時計遺伝子プロモーター活性の個体レベルの概日リズムは、ウキクサにおいて連続明、連続暗どちらの条件下においても減衰するが、特に連続暗条件下で顕著な減衰を示す⁵。前節で述べたが、連続暗条件下では細胞概日リズムそのものが減衰する傾向が強くみられる。一方で、連続明条件下では細胞概日リズムそのものは維持されるが、細胞間の脱同調が生じる¹¹ (図1C)。連続明条件下で育て続けていたウキクサ個体内の細胞発光概日リズムを統計的に解析した結果、ほとんどの細胞の周期は21~28時間の範囲にあることが明らかとなった。その平均周期は23.5時間、細胞間のバラツキ(標準偏差)は1.11時間、周期毎のバラツキは2.45時間と推定された。これらのバラツキがウキクサ個体レベルの概日リズムの減衰を引き起こす要因となっている。植物の細胞概日リズムのバラツキは動物よりやや大きい、植物も動物も同じく、細胞間の均質性が時間精度より優っている点に興味深い。5節で詳しく述べるが、通常自然条件下では昼夜があり、その周期的環境変動に概日時計を毎日合わせればよいので、周期毎のバラツキは大した不利益を生まないのかもしれない。また、シアノバクテリアのタンパク時計は優れた時間精度を示すことから、時計発振機構の面から考えて、転写・翻訳フィードバックシステムを基盤する植物や動物の概日時計は、この発振原理のせいで時間精度を上げるのが困難なのかもしれない²⁰。また、ほ乳類のSCNにおいては、バラバラにしたニューロンやSCNの神経伝達を阻害した状態のニューロンでは、細胞概日時計の時間精度は高くないが、通常SCNの時間精度は高く、スライスしたSCNの周期毎のバラツキ(標準偏差)は0.66時間と推定されており、臓器内での細胞間相互作用により同調状態を維持していると考えられる^{17,18,21}。この点は、ウキクサ個体内に生じる細胞概日時計の脱同調状態とは大きく異なっているが、植物においても個体という空間内で全く無秩序に細胞概日時計が発振しているわけではないことを次節で述べる。

4. 細胞概日時計の空間的秩序：フリーラン時と明暗同調時の違い

ウキクサという非常に小さな個体内ですら、連続明条件下でのフリーラン時は細胞概日時計の駄目さ加減が目立つ結果であったが、個体内の細胞間の距離と

細胞概日リズムの位相差との相関を分析した結果、細胞間の距離が0.5 mm以下であれば、細胞間の距離が近いほど平均的な位相差が小さくなる傾向がみられた¹¹。ただし、近距離にある細胞同士が常に近い位相を示すわけではなく、お互いに近い位相を示す期間が遠距離にある細胞と比較して長くなる傾向を示していた。つまり、近接的に働く同調促進作用がウキクサの個体内で生じている可能性が考えられる。このような近接領域での概日リズム同調に関する相互作用はシロイヌナズナでも示唆されている^{22,23}。近接領域の同調状態はみられても、恒常条件下に置かれた個体全体では、概日時計の位相が決まっていない状態で落ち着くようだ。恒常条件下で細胞概日リズムがバラバラになる状態が植物成長に与える影響については不明な点が多いが、ウキクサの場合、特に成長が悪くなったりすることは見られない。

言うまでもないが、植物がいる自然環境には昼夜変動があり、その周期的環境変動に個体全体として時計の時刻を合わせれば問題はないだろう。細胞概日リズムがバラバラな状態の植物でも明暗周期を与えることで、個々の細胞概日リズムは外部環境に速やかに同調することができる¹¹。連続明条件下で細胞概日時計の位相がバラバラになったウキクサ個体を12時間暗期に入れると個々の細胞がそれぞれの位相に依存して時計遺伝子の発現を変化させる。暗期が終了し、明期へ移行した後は、暗期突入時の位相によらず細胞概日時計はほぼ位相が揃った状態になる。ただし、暗期導入が導入前の概日時計が示す時刻と逆相になった細胞の場合は、一度の暗期では完全に位相が揃わず、12時間後にもう一度暗期を与えることで位相を揃えることができる。『位相が揃う』と言っているが、実際は程度の問題であり、細胞間でバラツキが見られる¹¹。明暗周期下での時計遺伝子発現ピーク時刻を細胞間で比較すると同一個体中でも2時間程度の範囲で時間差が観測される。同一個体内でも、連続明条件下での細胞概日リズムの周期にバラツキがみられることは前節で述べたが、それらの周期と位相(の遅れ)との間に弱い相関が見られた。つまり、細胞固有の周期が長いリズムは明暗周期下では位相が遅れる傾向が見られた。ただし、細胞間での2時間程度の位相差は、細胞概日時計の固有周期の違いに起因するというよりは、ウキクサ個体(フロンドと呼ぶ葉状体)の空間的な位置に大きく依存することが明らかとなった¹¹。フロンドの中心付近の細胞概日時計の位相は辺縁部の細胞概日時計の位相より1~2時間前進していた。観測している細胞は葉肉細胞という種類がほとんど

であり、その固有周期は空間的な位置によらない。一方で、植物個体で異なる器官間で概日リズムに関する非対称的な相互作用があることがシロイヌナズナで示されており^{24,25}、明暗周期下のウキクサにおいても器官配置などの構造的要因で位相の空間分布様式が決まっているのかもしれない。明暗条件下で中心から辺縁へと概日リズムの位相が移動していく現象の生理学的意義や形成メカニズムは不明であるが、個体レベルの概日時計システムを理解する上で重要な切り口になると期待される。

5. 細胞概日時計の『個性』の限度：許されるバラツキとは

これまで述べたように、恒常条件下でウキクサの葉肉組織の細胞概日リズムはそれぞれかなり自由に振舞う一方で、昼夜のある環境では空間的にも時間的にも統制のとれた振舞をしているようだ。言い換えると、同一組織／個体でも細胞単位で見ると概日時計はある程度『個性』を持っているが、明暗周期下ではその『個性』や時計自体の不確実性が減り、新規の秩序に組み込まれる。ここで『個性』と呼んだものは、同一細胞種の細胞間で長期的に生じる時計の性質の差であり、細胞間の固有周期のバラツキなどを生み出している。植物の場合、それぞれの細胞が成熟した後はその大きさは不変で、含まれる葉緑体の量もほぼ一定である。つまり、これらの細胞属性の細胞間のバラツキは長期的に固定された差であり、細胞概日時計の『個性』に反映するかもしれない。一方で、個々の細胞での時計関連遺伝子の発現レベルなど概日時計システム構成因子に生じる短期的なノイズが時間精度の低下（周期毎のバラツキ）の原因となっていると考えられる。様々な階層のバラツキを示す細胞概日時計が明暗周期下での時空間的秩序（統合性）のなかで統一的に動けるメカニズムは今後の課題であるが、明暗周期下における時間の制御に関して、光応答反応のような環境応答の影響が一義的であり、概日時計の周期の影響は小さいとの解釈も可能であろう。ただし、そのような解釈が可能なのは、概日時計の周期と環境変動周期が似ている時に限られるようだ。筆者の研究グループによって行われた、細胞概日時計の同調性に注目した T 実験[外部環境周期 (T) を 24 時間とは異なる周期長に設定した時の、生物の反応性の違いを解析する実験手法]では、24 時間より短い明暗周期に対して、細胞概日時計の周期の違いが同調性の差異をうみだせることを見出した²⁶。T=20 時間まではどの細胞概日時計も明暗周期に同調できるが、T=16 時間になる

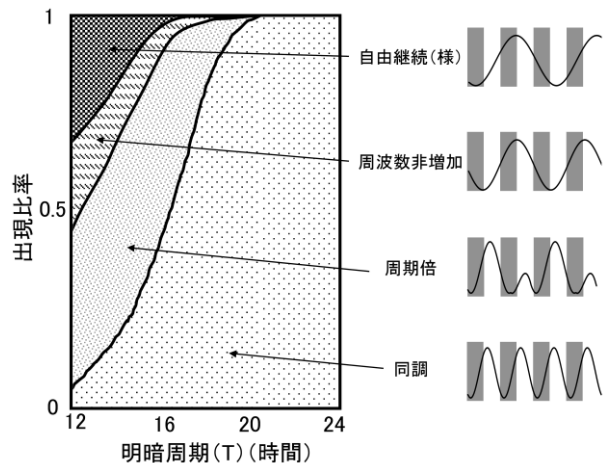


図3 ウキクサの細胞概日リズムの非 24 時間明暗周期への同調様式。イボウキクサの細胞概日リズムの T 実験(T = 24, 20, 16, 12 時間)でえられた結果を元に、図中右側に示した各同調様式の細胞の出現頻度を模式的に示す²⁶。

と 1 回の明暗には半端な同調しかできず、2 回の明暗で元の状態に戻る同調様式を示す細胞が半数程度出現する (図 3)。『周期倍』と呼ばれる現象だが、固有周期の長い細胞は T=16 時間でこの同調様式をとる傾向が強くみられた。つまり、細胞概日時計の固有周期のバラツキは、通常の昼夜環境 (24 時間周期) 下では顕在化しないが、外部環境周期が短くなると質的な違いを生じさせることがわかった。別の見方をすると、通常の 24 時間周期に合わせられる範囲であれば概日時計の固有周期は適当でよく、生物の概日時計システムはコストをかけてまで精度を上げることはしていないと解釈できる。さらに、明暗周期を 12 時間まで短くすると、細胞概日時計の同調様式が複雑化し、個々の細胞が異なる同調 (あるいは非同調) 様式を示すことがわかった (図 3)。これらの同調様式の異質性が同じ植物個体上の細胞で見られることから、少なくとも同調していない状況においては、個々の細胞が自律的に光応答していると考えられる。植物細胞において明暗周期への同調機構はある程度理解されているが⁴、T 実験の結果も取り入れることで、より本質的な議論が可能になると期待できる。

4. おわりに

本稿では、植物の細胞概日リズムの周期や明暗同調性など基本的な性質について、ウキクサ植物の結果を例として見てきた。ウキクサ以外の植物で細胞概日リズムの詳細な解析は行われておらず、その性質が植物一般にみられるかどうかは不明である。ただし、概日時計の周期がバラツク範囲については一般性がみられるかもしれない。世界各地から集められたシロイヌ

ナズナの株について、連続明条件下における葉の就眠運動の周期が株間で比較された結果、22~28時間の範囲でバラツクことが明らかとなった²⁷。この範囲はウキクサの細胞概日時計の周期のバラツク範囲とほぼ同じである。シロイヌナズナの株の周期と株が採取された場所の緯度との間には弱い相関（高緯度由来の株は周期が長くなる）が認められたが、株間のバラツキの程度は緯度の影響よりはるかに大きかった²⁷。植物においては細胞、組織、種の違いは細胞概日時計の周期の違いの制約とはなっておらず、昼夜環境への同調性のみがその制約となっているのかもしれない。植物は光合成をする独立栄養生物であり、細胞レベルで見ても動物と比較して独立性が強い傾向がある。また、植物の成長は光や水利用など日周変動する環境に強く依存し、基本的な代謝経路が日周環境変動の影響を直接的に受ける。そのことと対応するように、植物においては環境応答機構と概日時計システムの結びつきが強い²⁸。その結びつきの強さが植物の細胞概日時計の不安定性と関係あるのかもしれない。例えば、植物の光応答経路は時計発振機構とは不可分であるため、時計発振が頑健過ぎると光応答反応が効率よく行えない可能性が考えられる。環境応答と概日時計の挙動を細胞レベルで同時に観測することで、それぞれのシステムの安定性まで含めた時間制御システムの理論が構築できると期待される。そのような理論を通して、周期、位相、振幅など時計発振の基本的性質について、それらの最適値、限界値、バラツキ、安全マージンなどを実証的に議論できるようになるだろう。

参考文献

1. Sweeney, B. M. *Rhythmic Phenomena in Plants*. (Academic Press, 1987).
2. Noordally, Z. B. & Millar, A. J. Clocks in Algae. *Biochemistry* **54**, 171-183 (2015).
3. Linde, A. M. *et al.* Early evolution of the land plant circadian clock. *New Phytol.* **17**, 569-590 (2017).
4. Harmer, S. L. The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 357-377 (2009).
5. Miwa, K., Serikawa, M., Suzuki, S., Kondo, T. & Oyama, T. Conserved expression profiles of circadian clock-related genes in two *Lemna* species showing long-day and short-day photoperiodic flowering responses. *Plant Cell Physiol.* **47**, 601-612 (2006).
6. Serikawa, M., Miwa, K., Kondo, T. & Oyama, T. Functional conservation of clock-related genes in flowering plants: overexpression and RNA interference analyses of the circadian rhythm in the monocotyledon *Lemna gibba*. *Plant Physiol.* **146**, 1952-1963 (2008).
7. Yakir, E., Hassidim, M., Melamed-Book, N., Hilman, D., Kron, I. & Green, R. M. Cell autonomous and cell-type specific circadian rhythms in Arabidopsis. *Plant J.* **68**, 520-531 (2011).
8. Hillman, W. S. Endogenous circadian rhythms and the response of *Lemna perpusilla* to skeleton photoperiods. *Am. Nat.* **98**, 323-328 (1964).
9. Muranaka, T. & Oyama, T. Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. *J. Plant Res.* **131**, 15-21 (2018).
10. Muranaka, T., Kubota, S. & Oyama, T. A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body. *Plant Cell Physiol.* **54**, 2085-2903 (2013).
11. Muranaka, T. & Oyama, T. Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Sci. Adv.* **2**, e1600500 (2016).
12. Muranaka, T., Okada, M., Yomo, J., Kubota, S. & Oyama, T. Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant Biol.* **17**, 66-74 (2014).
13. Strayer, C. *et al.* Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768-771 (2000).
14. Nakajima, M. *et al.* Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* **308**, 414-415 (2005).
15. Mihalcescu, I., Hsing, W. & Leibler, S. Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria. *Nature* **430**, 81-85 (2004).
16. Herzog, E. D., Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y. & Tei, H. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythms* **19**, 35-46 (2004).

17. Welsh, D. K., Takahashi, J. S. & Kay, S. A. Suprachiasmatic nucleus: Cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 551-577 (2010).
18. Leise, T. L., Wang, C. W., Gitis, P. J. & Welsh, D. K. Persistent cell-autonomous circadian oscillations in fibroblasts revealed by six-week single-cell imaging of PER2::LUC bioluminescence. *PLOS ONE* **7**, e33334 (2012).
19. E. ビュニング著／古谷雅樹・古谷妙子訳. 生理時計. (学会出版センター, 1977).
20. Gonze, D., Halloy, J. & Goldbeter, A. Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 673-678 (2002).
21. Yamaguchi, S., *et al.* Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **302**, 1408-1412 (2003).
22. Fukuda, H., Nakamichi, N., Hisatsune, M., Murase, H. & Mizuno, T. Synchronization of plant circadian oscillators with a phase delay effect of the vein network. *Phys. Rev. Lett.* **99**, 98102 (2007).
23. Fukuda, H., Ukai, K. & Oyama, T. Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots. *Phys. Rev. E* **86**, 41917 (2012).
24. Endo, M., *et al.* Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature* **515**, 419-422 (2014).
25. Takahashi, N., Hirata, Y., Aihara, K. & Más, P. A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the *Arabidopsis* circadian system. *Cell* **163**, 148-159 (2015).
26. Okada, M., Muranaka, T., Ito, S. & Oyama, T. Synchrony of plant cellular circadian clocks with heterogeneous properties under light/dark. *Sci. Rep.* **7**, 317 (2017).
27. Michael, T. P., *et al.* Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* **302**, 1049-1053 (2003).
28. Greenham, K. & McClung, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 598-610 (2015).